

## ОСОБЕННОСТИ СТРОЕНИЯ ОДНОКЛЕТОЧНЫХ ДЕСМИДИЕВЫХ ВОДОРΟΣЛЕЙ (DESMIDIALES) ПРИ ИЗУЧЕНИИ В СКАНИРУЮЩЕМ ЭЛЕКТРОННОМ МИКРОСКОПЕ

© 2021 г. О. В. Анисимова<sup>1,\*</sup>, А. Ф. Лукнищкая<sup>2,\*\*</sup>

<sup>1</sup> Звенигородская биологическая станция им. С.Н. Скадовского, МГУ им. М.В. Ломоносова  
ул. Ленинские горы, 1/12, Москва, 119234, Россия

<sup>2</sup> Ботанический институт им. В.Л. Комарова РАН  
ул. Проф. Попова, 2, Санкт-Петербург, 197376, Россия

\*e-mail: flora\_oa@mail.ru

\*\*e-mail: aliyalukn@mail.ru

Поступила в редакцию 15.12.2020 г.

После доработки 11.02.2021 г.

Принята к публикации 16.02.2021 г.

Показана возможность применения методов сканирующей электронной микроскопии (СЭМ) при изучении морфологии и рельефа клеточной оболочки одноклеточных представителей десмидиевых водорослей (Charophyta, Zygnematorphyceae) для подтверждения и уточнения идентификации на примере 10 видов: *Cosmarium* sp., *C. anceps*, *C. granatum*, *C. nymannianum*, *C. pokornyuanum*, *Euastrum bidentatum*, *E. crassicole*, *E. luetkemuelleri*, *E. oblongum*, *Pleurotaenium ehrenbergii*. Продемонстрировано, что использование электронного микроскопа дает возможность более тонкого и качественного исследования поверхности клеточной оболочки. Рассмотрены трудности, возникающие при работе с клетками десмидиевых водорослей в СЭМ. Следует обращать внимание на артефакты, возникающие при подготовке проб для исследования водорослей в СЭМ: слизевые пробки и обильное скопление слизи на поверхности клетки, процесс линьки и асимметрия в развитии полуклеток.

**Ключевые слова:** Charophyta, Zygnematorphyceae, клеточная стенка, морфология, таксономия, сканирующий электронный микроскоп

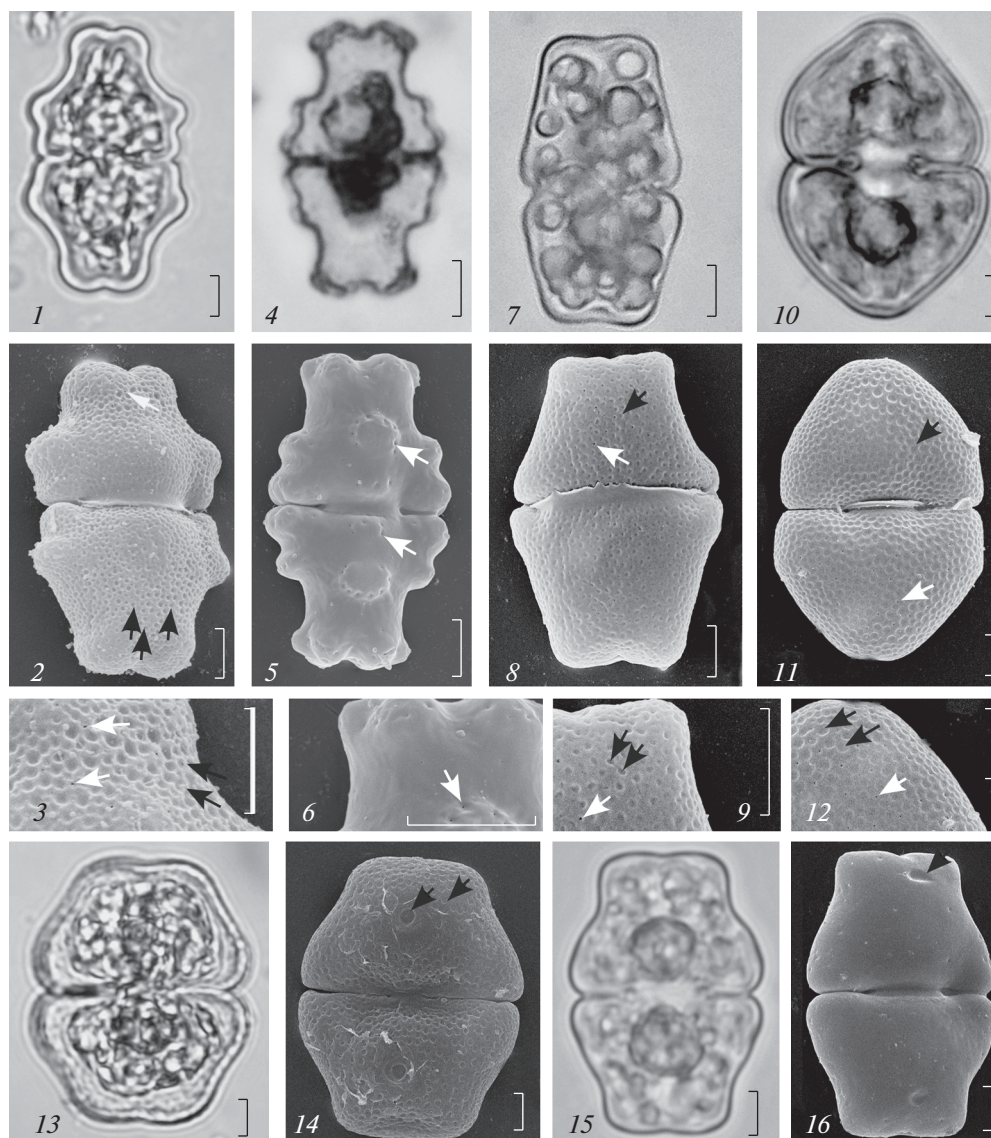
10.31857/S0006813621060028

Одноклеточные представители десмидиевых водорослей (Charophyta, Zygnematorphyceae, Desmidiaceae) характеризуются самой разнообразной формой клеток и их размерами. Морфологические диагностические признаки мелкоклеточных видов чаще всего плохо различимы в световом микроскопе. В первую очередь это относится к структуре клеточной стенки у видов родов *Cosmarium* и *Euastrum*, длина клеток которых не превышает 30 мкм. Сюда можно отнести такие виды как *Cosmarium tinctum* Ralfs, *C. inconspicuum* West et G.S. West, *C. tenue* W. Archer, *C. norimbergense* Reinsch, *C. trilobulatum* Reinsch, *Euastrum coeselii* Kouwets, *E. insulare* (Wittr.) J. Roy, *E. luetkemuelleri* F. Ducell., *E. validum* West et G.S. West и некоторые другие. Кроме того, существует ряд видов рода *Cosmarium* (*C. tatricum* Raciborski, *C. anceps* P. Lundell, *C. nymannianum* Grunow in Rabenh., *C. pokornyuanum* (Grunow) West et G.S. West), которые, несмотря на достаточно крупные размеры

(до 54 мкм длины), могут быть ошибочно отнесены к роду *Euastrum*, так как имеют некоторые признаки, характерные для этого рода (трехлопастная форма, верхушечная выемка, срединное вздутие).

Все сказанное выше значительно осложняет идентификацию таксонов, прежде всего с использованием светового микроскопа (СМ). Сведения о структуре клеточной оболочки необходимы для идентификации сложно определяемых видов *Cosmarium* и *Euastrum*. В подобной ситуации требуется изучение рельефа клеточной стенки в сканирующем электронном микроскопе (СЭМ).

Цель данного сообщения – продемонстрировать на примере некоторых из перечисленных выше видов, на какие признаки следует обращать особое внимание при изучении десмидиевых водорослей в СЭМ, и возникающие при этом трудности интерпретации.



**Рис. 1.** *Cosmarium pokornyuanum*: 1 – клетка, СМ, 2 – клетка, СЭМ, 3 – рельеф оболочки клетки, СЭМ; *Euastrum crassicolle*: 4 – клетка, СМ, 5 – клетка, СЭМ, 6 – рельеф оболочки клетки, СЭМ; *Cosmarium anceps*: 7 – клетка, СМ, 8 – клетка, СЭМ, 9 – рельеф оболочки клетки, СЭМ; *Cosmarium granatum*: 10 – клетка, СМ, 11 – клетка, СЭМ, 12 – рельеф оболочки клетки, СЭМ; *Cosmarium nymannianum*: 13 – клетка, СМ, 14 – клетка, СЭМ; *Euastrum luetkemuelleri*: 15 – клетка, СМ, 16 – клетка, СЭМ. Черные стрелки – ямки и скробиккулы, белые стрелки – слизевые поры. Масштабные линейки 5 мкм.

**Fig. 1.** *Cosmarium pokornyuanum*: 1 – cell, LM, 2 – cell, SEM, 3 – ornamentation of the cell wall, SEM; *Euastrum crassicolle*: 4 – cell, LM, 5 – cell, SEM, 6 – ornamentation of the cell wall, SEM; *Cosmarium anceps*: 7 – cell, LM, 8 – cell, SEM, 9 – ornamentation of the cell wall, SEM; *Cosmarium granatum*: 10 – cell, LM, 11 – cell, SEM, 12 – ornamentation of the cell wall, SEM; *Cosmarium nymannianum*: 13 – cell, LM, 14 – cell, SEM; *Euastrum luetkemuelleri*: 15 – cell, LM, 16 – cell, SEM. Black arrows – pits and scrobicules, white arrows – mucilage pores. Scale bars 5 μm.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Материалом для работы послужили пробы водорослей, собранные на полуострове Ямал в 1995 г. (Черное оз. 1, 50 × 30 м, обрастания на поверхности травяно-моховой мочажины на глубине 1 м и Черное оз. 2, 50 × 150 м, на торфяном дне на глубине 10 см) – *Cosmarium* sp., *C. granatum* Bréb. ex

Ralfs, *Euastrum bidentatum* Nägeli, *E. oblongum* Ralfs (Luknitskaya, 2001); на Карельском побережье Белого моря, в окрестностях Беломорской биологической станции МГУ в 2019 г. (безымянное сфагновое болото, обрастания водных растений по краю озера на глубине 20 см) – *Euastrum crassicolle* P. Lundell, *E. luetkemuelleri* (Anissimova, 2020), *Cosmarium anceps*, *Pleurotaenium ehrenbergii* (Ralfs)

De Bary; в Горном Алтае в 1996 г (бассейн Телецкого оз., Аю-Коль оз., отжим прибрежного мха на глубине 10 см) — *Cosmarium nymannianum*, *C. pokornyanum*, *Euastrum bidentatum*, *E. oblongum* (Anissimova, 2018). Пробы фиксировали формалином до конечной концентрации 4%. Материал изучали в световых (Amplival (Carl Zeiss, Jena), Leica DM—1000, с объективами  $\times 40$ ) и сканирующем электронном (Jeol JSM—6308LA) микроскопах. Препараты для СЭМ готовили по общепринятой методике (Anissimova, 2016).

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

На примере двух пар видов можно проследить сходство признаков между родами *Cosmarium* и *Euastrum*. В световом микроскопе полуклетки *Cosmarium pokornyanum* и *Euastrum crassicolle* видны как трехлопастные, с волнистыми боками и оттянутой, расширенной верхушкой (рис. 1, 1, 4). Такое описание обычно приводят для рода *Cosmarium*. Однако оба таксона можно описать также с позиции рода *Euastrum*: боковые лопасти разделены неглубокой выемкой на верхнюю и нижнюю, полярная лопасть вытянутая, апикальный вырез представлен небольшим углублением. При такой характеристике, по общему виду клетки *C. pokornyanum* скорее можно отнести к роду *Euastrum*.

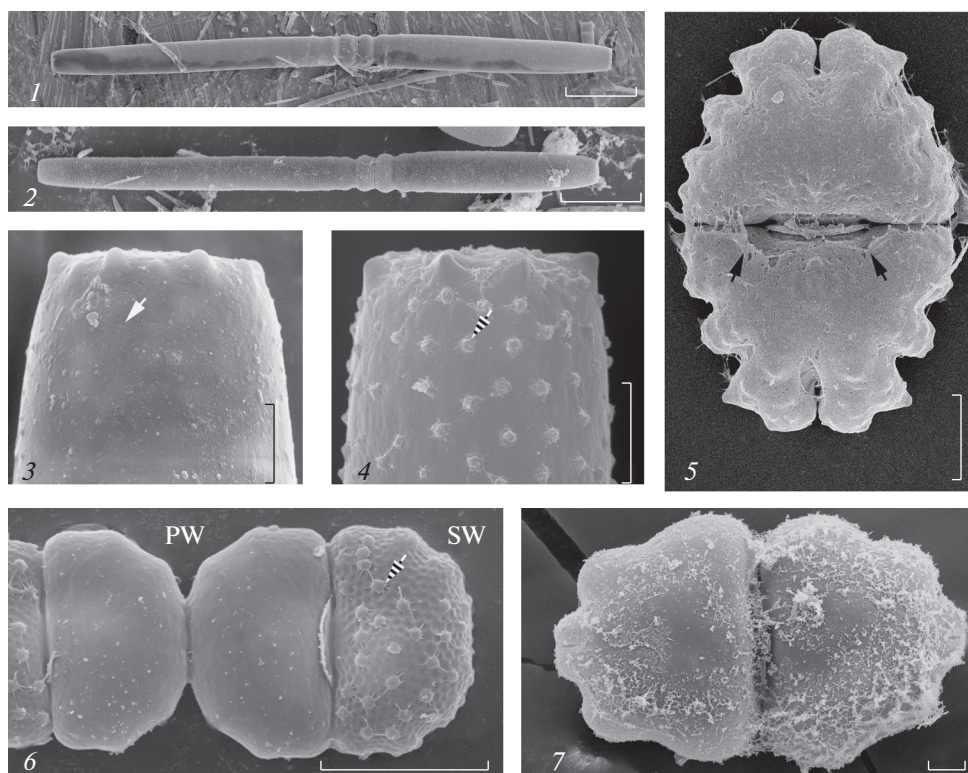
Изучение поверхности оболочки в СЭМ показывает, что у *Cosmarium pokornyanum* клеточная стенка равномерно покрыта мелкими ямками, образующими ячеистый рисунок (рис. 1, 2, 3, черные стрелки), в то время как у *Euastrum crassicolle* она гладкая (рис. 1, 5, 6). Первый вариант рельефа оболочки встречается у некоторых видов *Cosmarium*, таких как *C. anceps* (рис. 1, 7, 8, 9, черные стрелки), *C. granatum* (рис. 1, 10, 11, 12, черные стрелки). Очевидна и разница в распределении пор: у *Cosmarium* поры многочисленные, равномерно пронизывающие клеточную стенку (рис. 1, 3, 9, 12, белые стрелки), в то время как у *Euastrum crassicolle* поры группируются вокруг срединного и базального вздутий и на лопастях (рис. 1, 5, 6, белые стрелки). Следует отметить, что в световом микроскопе расположение пор у всех перечисленных видов не различимо.

Другая пара таксонов, сходных по общему виду, — *Cosmarium nymannianum* и *Euastrum luetkemuelleri*. Полуклетки первого вида описывают как усеченно-трапециевидные с выемчатой верхушкой, а полуклетки второго как усеченно-пирамидальные, полярная лопасть с угловатой выемкой посередине (рис. 1, 13, 15). Следовательно, форму полуклеток у этих двух таксонов можно считать почти одинаковой. Поверхность клеточной стенки *Cosmarium nymannianum* покрыта ямками, которые отсутствуют только вокруг срединного

углубления (рис. 1, 14, черные стрелки). Клетки *Euastrum luetkemuelleri* гладкие, небольшое углубление (скробикула) расположено немного выше центра полуклетки (рис. 1, 16, черная стрелка).

Безусловно, использование сканирующего электронного микроскопа позволяет четко видеть отличия рельефа оболочки у разных видов. Более того, в описании некоторых видов (*Cosmarium pokornyanum*, *C. anceps*, *C. granatum*) в основных определителях (Palamar-Mordvintseva, 1982; Coesel, Meesters, 2007) указывается гладкая оболочка. В ряде публикаций ямки и скробикулы ошибочно называют порами (Kosinskaya, 1960; Lenzenveger, 1999). Наличие скробикул на поверхности оболочки клеток и пор, пронизывающих края вершинного выреза полуклеток, являются важными признаками рода *Euastrum* (Anissimova, 2016). Однако на данный момент не известно исследования, которое позволило бы понять, как и когда формируются поровые каналы на вершине клетки в области синуса — до его полного формирования или одновременно. Это могло бы пролить свет на понимание, что можно называть вершинным вырезом (синусом), а что представляет собой небольшую вогнутость оболочки.

Следует учитывать, что в некоторых случаях при приготовлении препаратов для СЭМ возникают артефакты. Так, например, можно наблюдать слизевые “пробки” на месте слизевых пор. У крупных клеток (*Pleurotaenium ehrenbergii*, дл. 215–560 мкм) в зависимости от того, в какой момент они были зафиксированы, эти образования могут отсутствовать, тогда поры видны (рис. 2, 1, 3, белая стрелка) или присутствовать, тогда видны слизевые “пробки” (рис. 2, 2, 4, полосатая стрелка). На очень мелких клетках такие артефакты легко спутать с бородавками. Другая проблема, возникающая при изучении клеток в СЭМ — обильная сеть из слизи, маскирующая рельеф оболочки (*Euastrum bidentatum*, рис. 2, 5, черные стрелки). Известны статьи, в которых рассматриваются методы удаления слизи, однако они не всегда могут быть применимы, и эта проблема сохраняется до настоящего времени (Pickett-Heaps, 1974; Vidyavati, 1982; Tavera, Calderón, 2013). Еще одна особенность, относящаяся ко всем представителям из семейства Desmidiaceae — процесс линьки (Brook, 1981). Рельеф оболочки становится виден после полного освобождения от первичной целлюлозной клеточной стенки (*Cosmarium* sp., рис. 2, 6, SW). До этого момента поры, скробикулы или ямки на поверхности оболочки не видны (рис. 2, 6, PW). Трудности в оценке наблюдений в СЭМ десмидиевых водорослей могут создавать также недоразвитые клетки и оторвавшиеся недоразвитые полуклетки, которые иногда встреча-



**Рис. 2.** *Pleurotaenium ehrenbergii*: 1, 2 – общий вид клетки, 3, 4 – увеличенные концы полуклеток (СЭМ); *Euastrum bidentatum*: 5 – общий вид клетки в слизи (СЭМ); *Cosmarium* sp.: 6 – поделившиеся клетки (СЭМ); *Euastrum oblongum*: 7 – общий вид недоразвитой клетки (СЭМ). Белая стрелка – слизевые поры, полосатые стрелки – слизевые пробки, черные стрелки – слизь на поверхности клетки, PW – первичная оболочка у дочерних полуклеток сохранилась, SW – полуклетка после линьки. Масштабные линейки 1, 2 – 100 мкм, 3–7 – 10 мкм.

**Fig. 2.** *Pleurotaenium ehrenbergii*: 1, 2 – general view of a cell, 3, 4 – the ends of semicells (SEM); *Euastrum bidentatum*: 5 – general view of a cell with mucilage (SEM); *Cosmarium* sp.: 6 – dividing cells (SEM); *Euastrum oblongum*: 7 – general view of an underdeveloped cell (SEM). White arrow – mucilage pores, striped arrows – mucilage head, black arrows – mucilage on the cell wall, PW – the primary wall preserved on the “daughter” semicells, SW – the semicell after shedding of the primary wall. Scale bars: 1, 2 – 100 μm, 3–7 – 10 μm.

ются в препаратах (*Euastrum oblongum*, рис. 2, 7). Чтобы избежать ошибок при изучении этих водорослей в СЭМ, необходимо анализировать несколько экземпляров одного вида. Это также затруднительно, так как часто материал бывает бедный, и клетки встречаются редко.

Особенные сложности возникают при описании новых таксонов. Для большинства существующих видов в качестве типового образца приводится рисунок, а фиксированный материал зачастую оказывается недоступным. В подобном случае, при изучении вида в СЭМ, автор не всегда имеет возможность понять разницу в оболочках двух видов.

Таким образом, в настоящее время для уточнения определения трудно идентифицируемых таксонов десмидиевых водорослей желателно использование методов как световой, так и сканирующей электронной микроскопии с учетом всей совокупности морфологических признаков: раз-

меры и форма клетки, рельеф оболочки, расположение слизевых пор. Также следует внимательно сопоставлять структуры клеток, наблюдаемые в сканирующем электронном микроскопе и световом микроскопе, чтобы не допускать ошибок интерпретации.

#### БЛАГОДАРНОСТИ

Исследования выполнены в рамках государственного задания согласно тематическому плану Ботанического института им. В.Л. Комарова РАН по теме “Региональные таксономические и флористические исследования водорослей морских и континентальных водоемов”. Регистрационный номер: АААА-18-118030790036-0 и государственного задания МГУ, регистрационный номер: 121032300103-6, на оборудовании Центра коллективного пользования МГУ имени М.В. Ломоносова при финансовой поддержке Министерства образования и науки РФ.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Anissimova O.V. 2016. Architecture of cell wall of *Euastrum* Ralfs: new genus critheria. — Vestnik Moskovskogo Universiteta. Ser. 16. Biologia, 71 (3): 155–159. <https://doi.org/10.3103/S0096392516030019>
- [Anissimova] Анисимова О.В. 2018. К флоре десмидиевых водорослей (Streptophyta, Desmidiaceae) водных объектов Горного Алтая. — В кн.: Мат. XVII международной научно-практической конф. “Проблемы ботаники Южной Сибири и Монголии”. Барнаул. С. 8–11.
- [Anissimova] Анисимова О.В. 2020. Виды рода *Euastrum* (Charophyta, Desmidiaceae) новые для Карелии (Россия). — Бот. журн. 105 (4): 360–367. <https://doi.org/10.31857/S000681362004002X>
- Brook A.J. 1981. The biology of desmids. Oxford. 276 p.
- Coesel P.F.M., Meesters K.J. 2007. Desmids of the Lowlands. Mesotaeniaceae and Desmidiaceae of the European Lowlands. Zeist. 351 p.
- [Kosinskaya] Косинская Е.К. 1960. Флора споровых растений СССР. Т. V. Конъюгаты или сцеплянки. (2). Десмидиевые водоросли. Вып. 1. М.; Л. 706 с.
- Lenzenweger R., 1999. Desmidiaceenflora von Osterreich. Bibliotheca Phycologica. Stuttgart. 104 (3). 218 p.
- [Luknitskaya] Лукницкая А.Ф. 2001. Зеленые водоросли (конъюгаты) некоторых водоемов южной части полуострова Ямал. — Новости сист. низш. раст. 34: 30–34.
- [Palamar-Mordvintseva] Паламарь-Мордвинцева Г.М. 1982. Определитель пресноводных водорослей СССР. Л. 11 (2). 577 с.
- Pickett-Heaps J.D. 1974. Scanning electron microscopy of some cultured desmids. — Transactions of the American Microscopical Society J. 93: 1–23.
- Tavera R., Calderón E. 2013. Use of CTAB as a cost-effective solution to an old problem: the interference of the mucilage of desmids for scanning electron microscopy. — Phycologia. 52 (5): 422–425. <https://doi.org/10.2216/13-133.1>
- Vidyavati 1982. Cell division in *Staurastrum gracile* Ralfs under the scanning electron microscope. — Proc. Indian Acad. Sci. (Plant. Sci.). 91 (5): 443–447.

## Structural Features of Unicellular Desmids (Desmidiales) when Examined in a Scanning Electron Microscope

O. V. Anissimova<sup>a, #</sup> and A. F. Luknitskaya<sup>b, ##</sup>

<sup>a</sup> Zvenigorod Biological Station, M.V. Lomonosov Moscow State University  
Leninskiye Gory, 1/12, Moscow, 119234, Russia

<sup>b</sup> Komarov Botanical Institute RAS  
Prof. Popov Str., 2, St. Petersburg, 197376, Russia

<sup>#</sup>e-mail: flora\_oa@mail.ru

<sup>##</sup>e-mail: aliyalukn@mail.ru

We have demonstrated the possibility of using scanning electron microscopy methods for studying the morphology and ornamentation of the cell wall of unicellular species of desmid algae (Charophyta, Zygnematomyceae). Scanning electron microscopy was used to confirm and refine the identification of taxa with 10 species as an example: *Cosmarium* sp., *C. anceps*, *C. granatum*, *C. nymannianum*, *C. pokornyianum*, *Euastrum bidentatum*, *E. crassicolle*, *E. luetkemuelleri*, *E. oblongum*, *Pleurotaenium ehrenbergii*.

The use of electron microscope enables a more subtle and qualitative study of the cell wall surface. We considered the difficulties arising when working with cells of desmids in scanning electron microscopy. Attention should be paid to the artifacts arising from the preparation of samples for the study of algae in scanning electron microscopy: mucus plugs and abundant accumulation of mucus on the cell surface, “molting” process and asymmetry in the development of the semicells.

**Keywords:** Charophyta, Zygnematomyceae, cell wall, morphology, taxonomy, scanning electron microscope

## ACKNOWLEDGEMENTS

The studies were carried out within the framework of the institutional research project no. AAAA-A18-118030790036-0 of the Komarov Botanical Institute of the Russian Academy of Sciences and as part of the Scientific Project of the State Order of the Government of Russian Federation to Lomonosov Moscow State University No. 121032300103-6, on the equipment of the Center for Collective Use of Moscow State University with financial support of the Ministry of Education and Science of the Russian Federation.

## REFERENCES

- Anissimova O.V. 2016. Architecture of cell wall of *Euastrum* Ralfs: new genus critheria. — Vestnik Moskovskogo Universiteta. Ser. 16. Biologia. 71 (3): 155–159. <https://doi.org/10.3103/S0096392516030019>
- Anissimova O.V. 2018. К флоре десмидиевых водорослей (Streptophyta, Desmidiales) водных объектов Горного Алтая [To the flora of desmids (Streptophyta, Desmidiales) of the water bodies of Gorny Altai]. — In: Problemy botaniki Yuzhnoy Sibiri i Mongolii.

- Materialy XVII mezhdunarodnoi nauchno-prakticheskoi konferentsii. – Barnaul. P. 8–11 (In Russ.).
- Anissimova O.V. 2020. Species of *Euastrum* (Charophyta, Desmidiaceae) new for Karelia (Russia). – Bot. Zhurn. 105 (4): 360–367 (In Russ.).  
<https://doi.org/10.31857/S000681362004002X>
- Brook A.J. 1981. The biology of desmids. Oxford. 276 p.
- Kosinskaya E.K. 1960. Flora sporovykh rasteniy SSSR. T. 5. Konjugati ili stsep'yanki (2). Desmidievye vodorosli. Vyp. 1. [Flora of spore plants of the USSR. Vol. 5. Conjugates (2). (Desmidiales) 1]. Moscow; Leningrad. 706 p. (In Russ.).
- Lenzenweger R. 1999. Desmidiaceenflora von Osterreich. Bibliotheca Phycologica. Stuttgart. 104 (3). 218 p.
- Luknitskaya A.F. 2001. Green algae (conjugates) of some water bodies in the southern part of the Yamal Peninsula. – Novosti Sistematiki Nizshikh Rastenii. 34: 30–34 (In Russ.).
- Palamar-Mordvintseva G.M. 1982. Opredelitel' presnovodnykh vodorosley SSSR. [Key to freshwater algae of the USSR]. Leningrad. 11 (2). 577 p. (In Russ.).
- Pickett-Heaps J.D. 1974. Scanning electron microscopy of some cultured desmids. – Transactions of the American Microscopical Society J. 93: 1–23.
- Tavera R., Calderón E. 2013. Use of CTAB as a cost-effective solution to an old problem: the interference of the mucilage of desmids for scanning electron microscopy. – Phycologia. 52 (5): 422–425.  
<https://doi.org/10.2216/13-133.1>
- Vidyavati 1982. Cell division in *Staurastrum gracile* Ralfs under the scanning electron microscope. – Proc. Indian Acad. Sci. (Plant. Sci.). 91 (5): 443–447.